



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

LABORATÓRIO DE PROTOZOOLOGIA

CAROLINA MARIN ROCHA COELHO

**Avaliação da expressão heteróloga da glicoproteína de 82 KDa (gp82)
de *Trypanosoma cruzi* por *Trypanosoma rangeli***

CAROLINA MARIN ROCHA COELHO

**Avaliação da expressão heteróloga da glicoproteína de 82 KDa (gp82)
de *Trypanosoma cruzi* por *Trypanosoma rangeli***

Trabalho apresentado como requisito parcial para
a obtenção do título de bacharel em Ciências
Biológicas pela Universidade Federal de Santa
Catarina, por intermédio da disciplina de
Trabalho de Conclusão de Curso (BIO7016).

Orientadores:

Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard

Dr^a. Patrícia Hermes Stoco

2010

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
BLAST	(do ingles <i>Basic Local Aligment Search Tool</i>)
CEA	(do inglês <i>Chronic Exo Antigen</i>)
CRP	(do inglês <i>Complement Regulatory Protein</i>)
DAPI	(do inglês 4',6-diamidino-2-phenylindole)
DMEM	(do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EST	Etiquetas de sequências transcritas, (do inglês <i>Expressed Sequence Tag</i>)
Fn3	Fibronectina III
<i>g</i>	Força da gravidade
G418	Antibiótico aminoglicosídeo (Geneticin®)
GFP	(do inglês <i>Green Fluorescent Protein</i>)
cm	Centímetro
gp82	Glicoproteína de superfície de 82 KDa
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol
h	Hora
IgG	Imunoglobulina G
KDa	Quilodaltons
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIT	(do inglês <i>Liver Infusion Triptose</i>)
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NP40	Nonidet P40

ORESTES	ORF + EST
ORF	Quadro aberto de leitura (do inglês <i>Open Reading Frame</i>)
poli A	Oligonucleotídeo formado pela base adenina (A)
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	(do inglês <i>Sodium Dodecil Sulphate</i>)
SDS-PAGE	(do inglês <i>Sodium Dodecil Sulphate – Polyacrilamide Gel electrophoresis</i>)
TS	Trans-sialidase
V	Volt
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
µl	Microlitro
W	Watt

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Figura representativa das formas morfológicas de <i>Trypanosoma cruzi</i> . _____	1
Figura 2. Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição geográfica da distribuição da Doença de Chagas. _____	3
Figura 3. Representação esquemática do ciclo do <i>Trypanosoma rangeli</i> no hospedeiro invertebrado. _____	4
Figura 4. Representação esquemática dos membros da família das Trans-sialidases. _____	7
Figura 5. Representação esquemática do plasmídeo pTEX-8523eGFP. _____	13
Figura 6. Representação esquemática do plasmídeo pTEXeGFP. _____	13
Figura 7. Análise do crescimento das cepas transfectadas em relação às cepas controles. _____	17
Figura 8. Expressão heteróloga da gp82 e GFP na cepa <i>T. rangeli</i> -gp82 visualizada por imunofluorescência indireta. _____	18
Figura 9. Avaliação da expressão heteróloga das proteínas gp82 e GFP por <i>western blot</i> . _____	19
Figura 10. Localização celular da glicoproteína de superfície de 82 KDa. _____	21
Figura 11. Localização celular da GFP. _____	21
Figura 12. Imunofluorescência indireta do ensaio de interação parasito-célula hospedeira, após 45 minutos de interação. _____	22
Figura 13. Ilustração da interação celular de <i>T. rangeli</i> -gp82 com células vero, depois de 16 h do período de interação, lâminas preparadas com coloração de Giemsa. _____	23
Figura 14. Representação gráfica do número de parasitos internalizados em células vero. _____	23
Figura 15. Imunofluorescência indireta do ensaio de interação parasito-célula hospedeira após 72 horas de interação, utilizando o anticorpo anti- α -tubulina. _____	24
Figura 16. Imunofluorescência indireta do ensaio de interação parasito-célula hospedeira após 72h da interação, utilizando o anticorpo 3F6. _____	25

RESUMO

O *Trypanosoma rangeli* é um parasito hemoflagelado pertencente à Ordem Kinetoplastida, cuja região geográfica se sobrepõe a do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença da Chagas. Além disso, estes parasitos compartilham os mesmo reservatórios e vetores, o que pode levar a ocorrência de infecções únicas ou mistas, gerando diagnósticos falso-positivos da infecção. O ciclo de vida do *T. rangeli* ainda é relativamente desconhecido no hospedeiro mamífero. No entanto, apesar das dúvidas em relação à capacidade de invasão celular, certamente a interação destes parasitos com as células hospedeiras ocorre e envolve diferentes moléculas, especialmente antígenos de superfície, que podem ser alvos da resposta imune no hospedeiro mamífero. Este trabalho teve como principal objetivo avaliar aspectos da interação patógeno-célula hospedeira, através da expressão heteróloga da glicoproteína de 82 KDa (gp82) de *T. cruzi* pelo *T. rangeli* (*T. rangeli*-gp82), uma vez que esta proteína desempenha um papel fundamental no processo de adesão e penetração do *T. cruzi* nas células do hospedeiro. Verificou-se que a expressão heteróloga da gp82 não interfere no padrão de crescimento *in vitro* dos parasitos, mantendo-se estável mesmo após a metaciclogênese, apresentando uma expressão cerca de seis vezes menor nas formas tripomastigotas de *T. rangeli* quando comparada às formas tripomastigotas de *T. cruzi*. A localização celular da gp82 expressa de forma heteróloga foi semelhante no *T. rangeli*-gp82 e no *T. cruzi*, estando distribuída por toda a superfície dos parasitos não-permeabilizados e na região central dos parasitos permeabilizados. Os ensaios de interação entre o *T. rangeli*-gp82 e células Vero não apresentaram diferenças significativas em relação aos parasitos não transfectados quanto ao número de parasitos internalizados. Entretanto, por serem experimentos preliminares, o número amostral utilizado é insuficiente e não permite maiores inferências a respeito da capacidade da proteína gp82 em facilitar a adesão e penetração de parasitos transfectados nas células hospedeiras. Estudos de inibição de interação com o anticorpo 3F6 podem ser realizados a fim de se obter um controle negativo da interação. Além disso, sugere-se a construção de plasmídeos integrativos, contendo o gene de outras moléculas, também envolvidas no processo de interação celular.

Palavras-chave: gp82, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi*, interação celular, expressão heteróloga.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 <i>Trypanosoma rangeli</i>	1
1.2 Trans-sialidases / Sialidases	5
1.3 Justificativa	10
2. Objetivo Geral	11
2.1 Objetivos Específicos	11
3. Materiais e Métodos	12
3.1 Parasitos	12
3.2 Avaliação comparativa do crescimento	14
3.3 Linhagem celular	14
3.4 Detecção dos produtos de expressão plasmidial	14
3.5 Ensaio de Infecção	16
4. Resultados	17
4.1 Avaliação comparativa do crescimento	17
4.2 Detecção dos produtos de expressão plasmidial	18
4.3 Localização celular da gp82 e da GFP nas cepas transfectadas de <i>T. rangeli</i>	20
4.4 Análise comparativa da interação do <i>T. rangeli</i> transfectado com a gp82 de <i>T. cruzi</i> com a linhagem celular Vero	22
5. Discussão	26
6. Conclusões	30
7. Perspectivas	31
8. Referências	32

1. Introdução

1.1 *Trypanosoma rangeli*

O *Trypanosoma rangeli* é um parasito hemoflagelado de ciclo heteroxênico pertencente ao Filo Euglenozoa, Ordem Kinetoplastida, Sub-ordem Trypanosomatina, Família Trypanosomatidae. Este parasito foi originalmente descrito por Enrique Tejera em 1920, que observou formas flageladas no conteúdo intestinal de *Rhodnius prolixus* naturalmente infectados na Venezuela (D'ALESSANDRO, 1976).

Como organismo da Ordem Kinetoplastida, o *T. rangeli* é caracterizado pela presença de uma grande quantidade de DNA extra nuclear localizado em uma estrutura denominada cinetoplasto. O cinetoplasto corresponde a região de acúmulo de DNA mitocondrial (kDNA) da única mitocôndria destes organismos. Durante os últimos 20 anos sequências de kDNA têm sido utilizadas para o diagnóstico e caracterização de diversos tripanosomatídeos (VALLEJO et al., 1988). Além disso, um dos critérios para se diferenciar as formas evolutivas presentes em alguns membros da família Trypanosomatidae é a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo (HOARE; WALLACE, 1966; MASLOW; SIMPSON, 1995), como exemplificado para o *Trypanosoma cruzi* (figura 1).

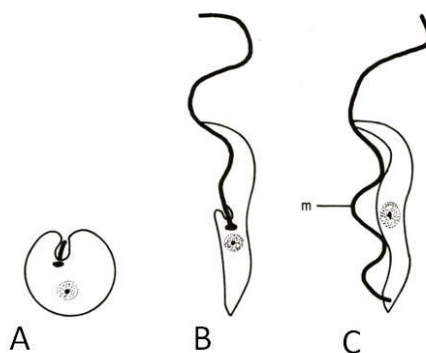


Figura 1: Figura representativa das formas morfológicas básicas de *Trypanosoma cruzi*. (A) Amastigota, (B) Epimastigota e (C) Tripomastigota (Fonte: adaptado de SIQUEIRA, 2005).

O *T. rangeli* apresenta três formas morfológicas predominantes, (1) as epimastigotas, presentes principalmente no intestino e fezes dos triatomíneos, caracteristicamente finos que podem atingir de

15 a 56 µm de comprimento; (2) as tripomastigotas metacíclicas, encontradas na glândula salivar do triatomíneo, sendo esta a forma infectante do parasito (CUBA CUBA, 1998) e (3) as tripomastigotas sanguíneas, presentes no hospedeiro mamífero, com 26 a 34 µm de comprimento, incluindo o flagelo. As formas tripomastigotas possuem um cinetoplasto subterminal pequeno e redondo, e seu núcleo encontra-se localizado aproximadamente no meio do corpo, sendo a membrana ondulante bastante desenvolvida. No triatomíneo, formas similares a amastigotas, esferomastigotas e tripomastigotas podem ser encontradas, desenvolvendo-se no intestino dos insetos infectados (VALLEJO et al., 1988).

Desde 1942, quando De Leon detectou o *T. rangeli* em sangue humano, enquanto estudava a Doença de Chagas na Guatemala, infecções por este parasito foram descritas em várias espécies de triatomíneos e mamíferos, nas Américas Central e do Sul (D'ALESSANDRO, 1976). O *T. rangeli* apresenta uma extensa variedade de reservatórios mamíferos, correspondentes às Ordens Xenarthra, Marsupialia, Carnivora, Rodentia e Primates (D'ALESSANDRO, 1976). Os reservatórios e vetores do *T. rangeli* são compartilhados com o *T. cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, com o qual também apresenta sobreposição geográfica, sendo encontrado desde a Guatemala até o Brasil (figura 2). As implicações epidemiológicas da coexistência destes dois parasitos residem na ocorrência de infecções únicas ou mistas, tanto nos hospedeiros invertebrados como nos mamíferos (GRISARD et al., 1999; GRISARD; STEINDEL, 2005).

Embora não seja considerado patogênico para o homem, o *T. rangeli* possui uma alta reatividade imunológica cruzada com o *T. cruzi*, uma vez que as suas formas epimastigotas compartilham cerca de 60% da sua constituição antigênica solúvel (AFCHAIN et al., 1979). Desta maneira, ocorre uma resposta humoral com elevados títulos de anticorpos, podendo levar a diagnósticos falso-positivos da Doença de Chagas, principalmente em sua fase crônica (GRISARD et al., 1999). Assim, o *T. rangeli* apresenta importância médica e epidemiológica relacionadas aos estudos da Doença de Chagas.



Figura 2: Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição geográfica da distribuição da Doença de Chagas humana (sombreado) e os registros de ocorrência comprovada do *Trypanosoma rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (●). (Fonte: GRISARD; STEINDEL, 2005).

Ciclo de vida

O ciclo biológico do *T. rangeli* no hospedeiro mamífero ainda não é totalmente compreendido. De maneira geral é bastante complexo e envolve distintas fases que apresentam significativas diferenças morfológicas e funcionais. Já o ciclo no hospedeiro invertebrado é relativamente bem conhecido (figura 3), sendo o inseto triatomíneo infectado pelo parasito (forma tripomastigota sanguínea) após sua ingestão durante a hematofagia. No trato intestinal do triatomíneo, os parasitos diferenciam-se em epimastigotas que, alguns dias após a infecção, aderem-se ao epitélio do intestino médio e o atravessam, alcançando a hemocela. Na hemolinfa, as formas epimastigotas multiplicam-se livremente e, então, migram para a glândula salivar do inseto, invadindo-a e diferenciando-se em tripomastigotas metacíclicos. Essas formas do parasito são infectantes e, através da via inoculativa, são transmitidas ao hospedeiro mamífero. É possível ainda, segundo estudos em laboratório, infectar camundongos com as fezes do triatomíneo, nas quais

podem ser encontradas formas tripomastigotas do parasito, demonstrando, assim, a possibilidade de diferenciação destes parasitos na ampola retal do hospedeiro primário (GRISARD; STEINDEL, 2005).

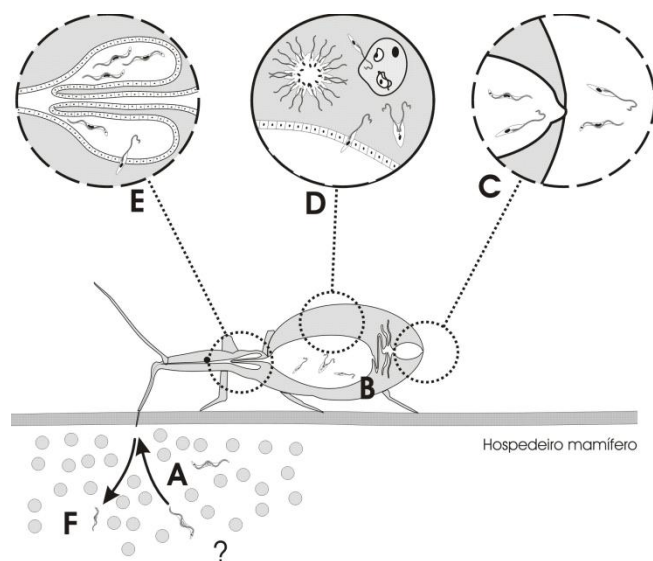


Figura 3: Representação esquemática do ciclo do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. A – Ingestão das formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo do triatomíneo; B – Formas epimastigotas no trato intestinal do triatomíneo; C – Parasitos alcançam a ampola retal; alguns se diferenciam em tripomastigotas e podem ser excretados junto a fezes e urina; D – Adesão de epimastigotas ao epitélio intestinal e migração para a hemocela, onde se multiplicam; E – Invasão das glândulas salivares e diferenciação para formas infectivas (tripomastigotas metacíclicas), as quais são inoculadas com a saliva (F) durante o repasto sanguíneo (Fonte: GRISARD; STEINDEL, 2005).

Diferentemente do que acontece no hospedeiro invertebrado, pouco se sabe a respeito do curso da infecção por este parasito no hospedeiro mamífero, o qual apresenta parasitemias sanguíneas normalmente muito baixas e de curta duração (D’ALESSANDRO et al., 1976). Interações de culturas de parasitos das cepas SC-58 clone B1, Macias e Choachí com macrófagos murinos revelaram taxas de infecção entre $10,5 \pm 2,6\%$ e $14,4 \pm 1,4\%$ após 1 hora de interação. No entanto, independente da cepa de *T. rangeli*, a porcentagem de células infectadas decresceu significativamente após 3 horas de interação, sendo que após 48 horas grandes vacúolos eram observados com ausência de parasitas intracelulares (EGER-MANGRICH et al., 2001). Em contraposição, Zuñiga et al. (1997) descreveu interações de células Vero e J774 com a cepa C23 de *T. rangeli*, mostrando um elevado número de formas amastigotas após o oitavo dia de infecção como

resultado de multiplicação intracelular. Assim, os dados a respeito da interação celular e da multiplicação do *T. rangeli* no seu hospedeiro mamífero são escassos e bastante controversos.

Apesar das dúvidas em relação a capacidade de invasão celular, certamente a interação destes parasitos com as células hospedeiras ocorre e envolve diferentes moléculas, tanto no *T. cruzi* como no *T. rangeli*, especialmente antígenos de superfície, que podem ser alvos da resposta imune no hospedeiro mamífero.

1.2 Trans-sialidases / Sialidases

Dentre estes antígenos de superfície tanto o *T. cruzi* quanto o *T. rangeli* expressam uma grande variedade de proteínas e de glicoproteínas, sendo que algumas delas são cruciais nos processos de adesão e de penetração do parasito na célula hospedeira pelo *T. cruzi* (ANDREWS et al., 1988; BARRY et al., 1990; KATZIN; COLLI, 1993; MANQUE et al., 2000; BUSCAGLIA, et al., 2006).

Na tentativa de melhor investigar estes processos no *T. rangeli*, entre 2001 e 2007, o Laboratório de Protozoologia (<http://www.proto.ufsc.br>) e o Laboratório de Bioinformática (<http://www.bioinformatica.ufsc.br>) da UFSC desenvolveram um estudo acerca do transcriptoma do *T. rangeli*, tendo gerado sequências gênicas de formas epimastigotas e tripomastigotas de duas cepas de distribuição geográfica polar do parasito (SC-58 e Choachí), utilizando as técnicas de EST (*Expressed Sequence Tags*) (SNOEIJER et al., 2004) e de ORESTES (*ORF EST*) (GRISARD et al., 2010). Dentre estas sequências destacam-se genes e/ou pseudogenes da superfamília das Trans-sialidases (TS), incluindo a glicoproteína gp82 de *T. cruzi* (GRISARD et al., 2010).

As trans-sialidases (TS) são enzimas capazes de transferir ácido siálico de glicoconjugados da célula hospedeira para o parasito, sendo este um processo chave na infecção celular pelo *T. cruzi*. O ácido siálico é sintetizado e exposto em glicoconjugados e/ou polímeros em células eucarióticas superiores e em certas bactérias. Como um componente da superfície destas células, o ácido siálico tem um papel duplo na interação célula-célula promovendo-as, como ligantes para proteínas reconhecedoras de ácido siálico, mas inibindo-as, ou por mascarar os sítios de reconhecimento ou devido a sua carga negativa (FRASCH, 2000). Por causa de suas características, a presença do ácido

siálico influencia grandemente o processo de reconhecimento de muitas células (COLLI, 1993; SCHENKMAN et al, 1994; JÄGER et al., 2008). As enzimas que transferem o ácido siálico possuem um papel crucial no ciclo celular do *T. cruzi*, especialmente no processo de invasão celular, já que o mesmo não sintetiza ácido siálico. A importância deste processo é indicada pelo fato de o *T. cruzi* possuir centenas de genes codificantes para TS, TS-like e mucinas (FRASCH, 2000).

Apesar da importância das TS para o *T. cruzi*, o *T. rangeli* não apresenta atividade de trans-sialidase (PONTES DE CARVALHO et al., 1993) e a função das sialidases no ciclo de vida deste parasito ainda não foi esclarecida. No entanto, foi demonstrada a presença e a expressão de glicoproteínas de superfície por formas epimastigotas do *T. rangeli* (CHIURILLO et al., 2002; 2005). E, em 2001, Harrison et al. descreveu a estrutura do cristal da sialidase de *T. rangeli*, que apresentou elevada identidade (70%) com o core da região globular da trans-sialidase de *T. cruzi* (HARRISON et al., 2001),

Classificação

A superfamília das TS no *T. cruzi* pode ser subdividida em quatro famílias ou grupos (COLLI, 1993; CROSS et al., 1993; FRASCH, 2000; EL SAYED et al., 2005). Os membros de uma dada família apresentam $\geq 60\%$ de similaridade entre si, enquanto que a similaridade encontrada entre os membros de diferentes famílias pode variar entre 20-40%. Todos os membros apresentam na região 3' do gene uma sequência que codifica um motivo constituído pelos aminoácidos VTVxNVfLYNR (figura 4), que tem homologia com o módulo III da fibronectina (Fn3), onde “x” representa um resíduo não conservado. Outra sequência bastante conservada é a que codifica um motivo denominado Asp, constituído pelos aminoácidos SxDxGxTW. O motivo Asp foi originalmente descrito em neuraminidases bacterianas (CRENNEL et al., 1993; ROGGENTIN et al., 1993), estando presente nas trans-sialidases e em outras proteínas de superfície da família ou grupo II da superfamília das TS que não possuem atividade enzimática conhecida. Os membros das famílias I e II estão ancoradas à superfície da membrana através de uma molécula de glicosil-fosfatidil-inositol (âncora GPI).

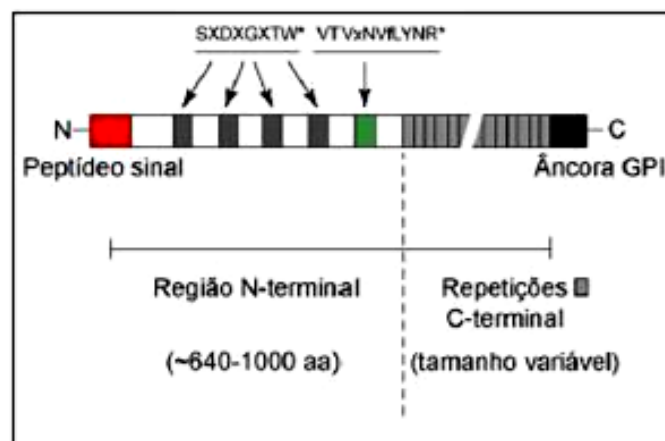


Figura 4: Representação esquemática dos membros da família das trans-sialidases. Em vermelho destaca-se o peptídeo sinal; as caixas cinza escuro simbolizam os domínios “Asp” (SxDxGxTW) e a caixa verde simboliza o domínio “VTV” (VTVxNVfLYNR). Na região carboxi-terminal destacam-se as repetições (caixa cinza claro) e o sinal para ancoragem por GPI (caixa preta) (Fonte: CORDERO, 2007).

A família ou grupo I é constituída por proteínas com atividade de neuraminidase e/ou trans-sialidase. A participação da TS na interação do *T. cruzi* com a célula hospedeira tem sido demonstrada (MING et al., 1993; TOMLINSON et al., 1994; SCHENKMAN et al., 1994), revelando que a adesão e invasão da célula hospedeira envolvem moléculas da superfície do parasito que contém ácido siálico (HALL et al., 1992). A transferência de resíduos de ácido siálico para a superfície do parasito protege as formas tripomastigotas da lise mediada pela via alternativa do complemento (TOMLINSON et al., 1994). Além destas funções, a TS também está envolvida no escape dos tripomastigotas do fagolisossoma para o citoplasma da célula hospedeira (HALL et al., 1992).

A família ou grupo II da superfamília TS reúne glicoproteínas de massas moleculares de 70-90 KDa (Tc85, gp85, gp82, gp90) presentes na superfície das formas tripomastigotas do *T. cruzi*, sem atividade enzimática conhecida, mas com comprovado envolvimento na interação parasito-hospedeiro (YOSHIDA, 1983; TEIXEIRA et al., 1986; RAMIREZ et al., 1993; SANTORI et al., 1996; 1996a). Anticorpos monoclonais contra epítomos presentes nestas moléculas reagem preferencialmente com as formas metacíclicas, sugerindo a existência de epítomos estágio-específicos (TEIXEIRA et al., 1986).

No terceiro grupo da superfamília TS estão incluídos os genes de proteínas de massas moleculares de cerca de 160 KDa, como a FL-160, a CEA (*Chronic Exo Antigen*) e a 160 kDa-CRP (*Complement Regulatory Protein*) localizadas na região da bolsa flagelar das formas tripomastigotas de *T. cruzi* (KRETTLI; BRENER, 1982; VAN VOORHIS et al., 1993; JAZIN et al., 1994). Estas proteínas caracterizam-se pela presença do motivo VTVxNVFLYNR na região C-terminal e ausência dos motivos Asp. Estas moléculas ainda compartilham epítomos com proteínas do tecido nervoso do hospedeiro mamífero (KRETTLI; BRENER, 1982; VAN VOORHIS et al., 1991; 1993; JAZIN et al., 1994;). Segundo alguns autores, a existência de reação cruzada entre estes componentes poderia desencadear reação auto-imune na Doença de Chagas. Os antígenos de 160 kDa também estão envolvidos com a resistência das formas tripomastigotas à lise mediada pelo complemento (KRETTLI; BRENER, 1982).

O quarto grupo é composto de genes que codificam antígenos de superfície de formas tripomastigotas cujas propriedades biológicas são desconhecidas (FRASCH, 2000). A presença do motivo VTVxNVfLYNR permite incluí-los na superfamília TS, apresentando repetições de aminoácidos na região C-terminal.

GP82

A glicoproteína de 82 kDa (gp82) de *T. cruzi* pertence ao grupo ou família II da superfamília TS e apresenta cerca de 40-56% de identidade em nível de aminoácidos com a glicoproteína gp85 (VAN VOORHIS et al., 1993; SANTORI et al., 1996). As regiões de similaridade estão concentradas na região carboxi-terminal, incluindo os motivos Asp e VTVxNVfLYNR e uma região hidrofóbica que pode servir como sinal para adição da âncora de GPI.

O gene que codifica para proteína gp82 apresenta uma fase aberta de leitura que sintetiza um precursor de aproximadamente 70 KDa, ao qual adicionam-se resíduos de açúcares *N*-ligados (RAMIREZ et al., 1993). Desta forma, as modificações pós-traducionais, como por exemplo, a glicosilação, são as responsáveis pelas diferenças de tamanho encontradas entre as proteínas predita e

nativa (KRETTLI; BRENER, 1982; VAN VOORHIS et al., 1993; JAZIN et al., 1994; BUSCHIAZZO et al., 1997;).

A gp82 é reconhecida pelo anticorpo monoclonal 3F6 e está presente na superfície de todas as cepas de *T. cruzi* examinadas (TEIXEIRA et al., 1986; RAMIREZ et al., 1993). Várias evidências sugerem o envolvimento desta molécula no processo de penetração do parasito na célula hospedeira, uma vez que a internalização de tripomastigotas metacíclicos em células Vero é inibida pelo anticorpo monoclonal 3F6, pelo antígeno purificado ou por peptídeos sintéticos contendo sequências da gp82 e, também pelo fato de o antígeno purificado ligar-se à célula hospedeira de maneira saturável e dose-dependente (RAMIREZ et al., 1993; SANTORI et al., 1996; 1996a; YOSHIDA et al., 2008).

Estudos subsequentes indicaram que a gp82 promove a entrada de tripomastigotas metacíclicos (forma infectante) na célula hospedeira através de uma cascata de sinalização e mobilização de Ca^{2+} em ambas as células (RUIZ et al., 1998; YOSHIDA et al., 2000). O envolvimento da gp82 na infecção oral por *T. cruzi* também foi inferido através de um experimento em que a infectividade de tripomastigotas metacíclicos da cepa CL foi reduzida após tratamento com o anticorpo 3F6 (NEIRA et al., 2003). Outras glicoproteínas, com função semelhante a da gp82, também foram avaliadas quanto ao seu envolvimento na infecção oral, como por exemplo a gp30. No entanto, mesmo que outras moléculas estejam envolvidas neste processo, a infecção oral depende da expressão de gp82, principalmente porque esta promove a adesão à mucosa gástrica, sendo o primeiro passo para a penetração na camada basal de células epiteliais (YOSHIDA, 2006).

1.3 Justificativa

Considerando a existência de cerca de nove milhões (SCHOFIELD et al., 2006) de chagásicos nas Américas, sendo 2 a 3 milhões em território brasileiro (OLIVEIRA et al., 2008), a comprovada sobreposição geográfica, a ocorrência de infecções únicas ou mistas, a reatividade sorológica cruzada entre o *T. cruzi* e o *T. rangeli* (GRISARD et al., 1999), bem como a escassez de dados a respeito do genoma e do proteoma do *T. rangeli*, o estudo de proteínas de superfície reveste-se de suma importância, podendo seus resultados contribuir para o esclarecimento da biologia deste parasito e para a compreensão de importantes aspectos da interação patógeno-célula hospedeira na infecção chagásica.

Além disso, uma vez que a glicoproteína de 82 KDa presente na membrana de formas tripomastigotas de *T. cruzi* possui um gene homólogo em *T. rangeli*, maiores estudos direcionados a esta proteína, bem como a expressão heteróloga da mesma em *T. rangeli*, poderão contribuir para a elucidação de questões fundamentais que diferenciam estes dois parasitos, como a presença ou não de um ciclo intracelular e a patogenicidade para o hospedeiro mamífero.

2. Objetivo Geral

Avaliar o envolvimento da gp82 no processo de interação celular *in vitro* a partir da expressão heteróloga desta proteína de *T. cruzi* por *T. rangeli*.

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar os níveis de expressão da gp82 na cepa Choachí de *T. rangeli* transfectada com o plasmídeo pTEX-8523eGFP;
- Estudar a citolocalização da gp82 de *T. cruzi* expressa de forma heteróloga em *T. rangeli*;
- Analisar a interação *in vitro* do *T. rangeli* expressando a gp82 de *T. cruzi* com a linhagem celular Vero.

3. Materiais e Métodos

3.1 Parasitos

Formas epimastigotas da cepa Choachí de *T. rangeli* e da cepa Y de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) a 27°C, através de passagens semanais.

Tripomastigotas de cultura de *T. rangeli* foram obtidos no 7º dia de cultivo em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) pH 8,0 conforme descrito por Koerich et al. (2002). Após este período os parasitos foram lavados três vezes em PBS (Tampão salina-fosfato) estéril, pH 7,4, por centrifugação a 1.300 x g por 10 minutos a 4 °C antes dos ensaios de interação.

Para obtenção de tripomastigotas de cultura de *T. cruzi*, monocamadas de células Vero foram infectadas com a cepa Y, sendo as formas tripomastigotas obtidas do sobrenadante das culturas após 72 horas de infecção (EGER-MANGRICH et al., 2001) e lavadas com PBS antes dos ensaios de interação conforme o descrito acima.

Neste estudo, foram utilizados cepas de *T. rangeli* transfectadas com o plasmídeo denominado pTEX-8523eGFP (figura 5) (denominada *T. rangeli*-gp82), que contém o gene da gp82 e o peptídeo sinal (SP) da gp85 de *T. cruzi*, além da inserção do gene GFP (*Green Fluorescent Protein*) que confere ao parasito a fluorescência verde quando observado em microscópio, sob luz ultravioleta. Parasitos transfectados somente com o plasmídeo pTEXeGFP (figura 6), este gentilmente cedido pelo Dr. John Kelly da *London School of Hygiene and Tropical Medicine*, Reino Unido, (denominada *T. rangeli*-GFP), e parasitos não transfectados foram utilizados como controle nos experimentos. Os parasitos transfectados foram mantidos em meio LIT suplementado com 10% de SBF a 27 °C com passagens semanais, acrescidos de 100 µg/ml de G-418 para *T. rangeli*-gp82 e 500 µg/ml de G-418 para *T. rangeli*-GFP.

pTEX-8523 eGFP

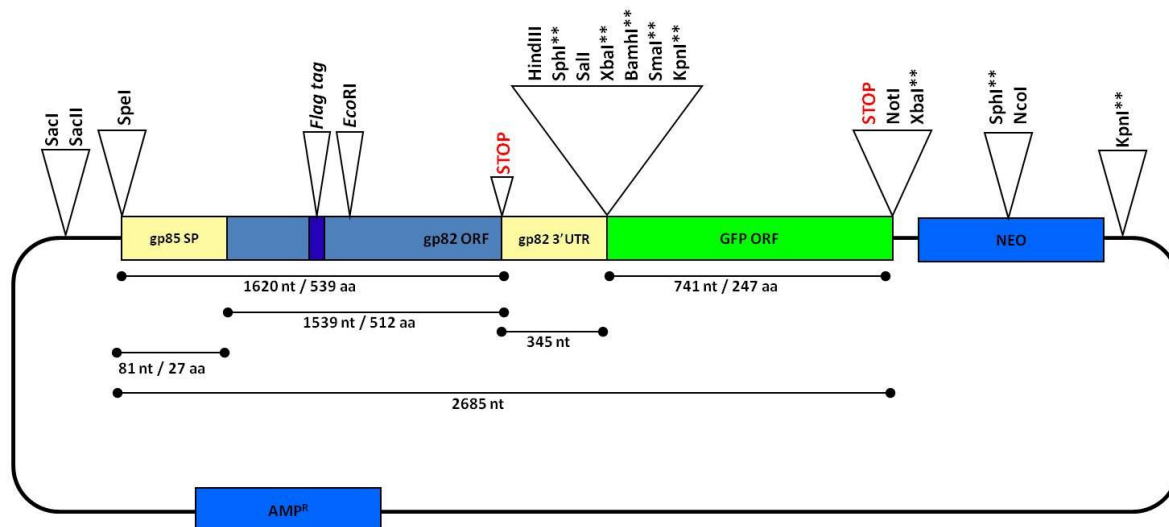


Figura 5: Representação esquemática do plasmídeo pTEX-8523eGFP indicando as posições dos sítios de enzimas de restrição, do peptídeo sinal da gp85 (gp85 SP) e da região 3' não traduzida da gp82 (gp82 3' UTR) de *Trypanosoma cruzi*.

pTEX eGFP

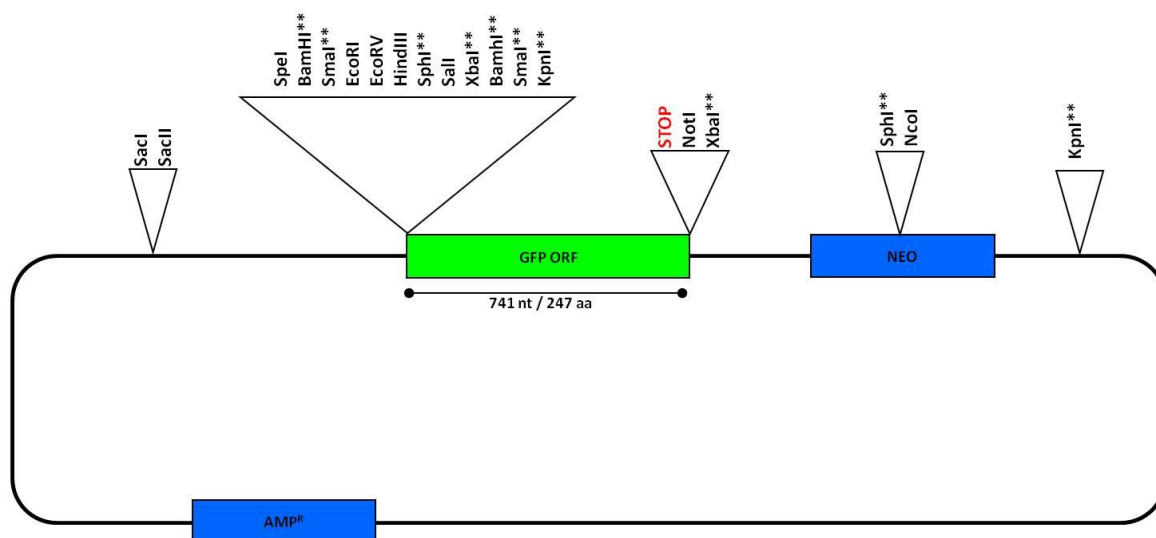


Figura 6: Representação esquemática do plasmídeo pTEXeGFP indicando os sítios das enzimas de restrição.

3.2 Avaliação comparativa do crescimento

A fim de se fazer uma avaliação comparativa do crescimento das cepas transfectadas em relação as cepas selvagens dos parasitos, formas epimastigotas de culturas em fase exponencial de crescimento foram ajustadas para uma concentração de 2×10^6 parasitos/ml em meio LIT e contados em câmara de Neubauer diariamente, durante 12 dias, em duplicata.

3.3 Linhagem celular

Foi utilizada, nos ensaios de interação celular com o *T. rangeli*, a linhagem celular Vero, célula epitelial derivada de rins de macacos da espécie *Cercopithecus aethops sabaeus*. As células foram cultivadas em meio DMEM, com 5% de SBF a 37°C em 5% de CO₂, através de passagens semanais ou quando atingiram confluência celular.

3.4 Detecção dos produtos de expressão plasmidial

Afim de confirmar e avaliar o nível de expressão das proteínas heterólogas em *T. rangeli* foram realizados ensaios de imunofluorescência indireta e de *western blot* a partir das culturas de parasitos transfectados.

Imunofluorescência indireta (RIFI)

A detecção dos produtos de expressão plasmidial através de ensaios de imunofluorescência indireta foi realizada conforme o preconizado por Haynes et al. (1996). Resumidamente, os protozoários mantidos em meio LIT foram coletados por centrifugação a $1.300 \times g$ por 10 minutos e lavados duas vezes em PBS por centrifugação nas mesmas condições. A concentração de células foi ajustada para 1×10^6 células/ml, e aproximadamente 50 µl da suspensão celular foi depositada em lamínula (13 x 13 cm) para subsequente fixação com paraformaldeído 4% diluído em PBS durante cinco minutos. Após três lavagens de cinco minutos com PBS, foi feita a permeabilização dos parasitos com 0,5% Nonidet P40 (NP40) durante cinco minutos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de bloqueio (5% leite desnatado diluído em PBS-Tween 0,1%) durante 16 horas a 4°C. Os diferentes anticorpos primários (anti-gp82/1:50 e anti-GFP/1:50) foram adicionados

sobre as lamínulas permanecendo em contato com o antígeno durante uma hora e meia a temperatura ambiente. Após novas lavagens, o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa-fluor 488 ou Alexa-fluor 594 (Molecular Probes) foi diluído 1:1.000 em leite desnatado 0,5% diluído em PBS 1X e mantido sobre as lamínulas por quinze minutos protegidos da luz. Após três lavagens de cinco minutos em PBS-Tween 0,1% as lamínulas foram coradas com 1 µg/ml de 4',6-diamidino-2-phenilindole (DAPI) por cinco minutos, lavadas novamente e montadas com o reagente Hydromount (National Diagnostics) sobre lâminas de vidro. As análises foram realizadas em microscópio Olympus – Bx40–FL (Olympus) e os resultados digitalmente registrados.

Western Blot

Para os ensaios de *western blot*, as culturas foram lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas por 10 minutos a 1.300 x g. Ao precipitado foram adicionados cinco volumes de tampão de lise (50 mM NaCl, 200 mM Tris HCl pH 8,0 e 1% de NP-40) e inibidor de protease (1 µg/µl), sendo as amostras centrifugadas durante 25 minutos a 14.000 x g a 4°C. Após a extração, as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford e submetidas a separação eletroforética em gel SDS-PAGE 10%, a 100V durante aproximadamente 2 horas. Após esta separação, as proteínas foram submetidas à transferência para membrana de PVDF (BioRad), durante 30 minutos a 25 V em módulo de transferência TE 77 PWR *Semi-Dry Transfer Unit*® (GE Healthcare). Terminada esta etapa, a membrana foi mantida em solução de bloqueio (5% leite desnatado diluído em PBS-Tween 0,1%) por 16 horas e lavada cinco vezes por cinco minutos com tampão de transferência (25 mM Tris HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Os anticorpos primários (anti-gp82/1:250 e anti-GFP/1:1.000) foram adicionados às membranas e mantidos durante uma hora e trinta minutos a temperatura ambiente sob agitação branda. A ligação do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma) ocorreu após cinco lavagens das membranas, em uma diluição de 1:10.000, sendo as membranas reveladas através da utilização do reagente ECL (GE Healthcare) e exposição a filmes radiográficos durante 5 minutos a temperatura ambiente, os quais

foram revelados utilizando o processador de filmes SRX-101A (Konica Minolta Medical & Graphic).

3.5 Ensaio de Infecção

Os ensaios cinéticos de interação de formas tripomastigotas da cepa *T. rangeli*-gp82, utilizando como controle as cepas *T. rangeli*-selvagem, *T. rangeli*-GFP e Y de *T. cruzi*, foram conduzidos através do cultivo de monocamadas celulares não confluentes da linhagem celular Vero sobre lamínulas de vidro, conforme o descrito por Croxford et al. (2005) com pequenas modificações. Em suma, formas tripomastigotas das duas espécies foram adicionadas sobre as monocamadas celulares a uma razão parasito:célula de 30:1. Transcorridas três horas de interação as células foram lavadas com PBS e novamente mantidas, em meio DMEM, por períodos de 45 minutos, 180 minutos, 16 horas e 72 horas. Decorrido este tempo, uma das lamínulas de cada tempo do experimento foi corada pelo método de Giemsa e as demais submetidas a imunofluorescência indireta, conforme descrito no item 3.4 desta mesma seção de materiais e métodos, com algumas alterações.

4. Resultados

4.1 Avaliação comparativa do crescimento

Os experimentos tiveram início assim que se obteve uma cultura homogênea dos parasitos transfectados com os plasmídeos pTEX-8523eGFP e pTEXeGFP. A homogeneidade das culturas foi avaliada visualmente considerando aspectos morfológicos e, também, pela intensidade da fluorescência dos parasitos, decorrente da expressão do gene que codifica para a GFP. A partir desta análise inicial, foi possível fazer uma avaliação comparativa do crescimento das cepas transfectadas em relação às cepas selvagens (figura 7).

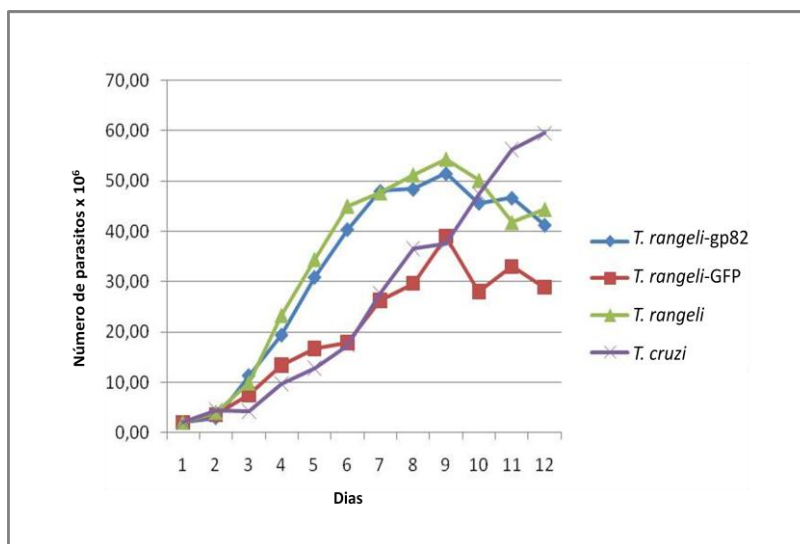


Figura 7: Análise comparativa do crescimento das cepas transfectadas em relação às cepas controles.

O resultado foi uma curva de crescimento padrão e semelhante entre as cepas de *T. rangeli-gp82* e Choachí selvagem, com um número máximo de parasitos no nono (9º) dia, atingindo $54,75 \times 10^6$ parasitos/ml. A análise dos dados através do teste Tukey (GraphPad Instat) não detectou diferenças significativas entre o crescimento das duas cepas ($p > 0,05$). Isto nos permite inferir que a transfecção realizada não alterou o padrão de crescimento observado na manutenção destes parasitos em meio de cultura. No entanto, os parasitos *T. rangeli-GFP* apresentaram um crescimento menor, com uma diferença estatística significativa, em relação à cepa selvagem (Choachí).

4.2- Detecção dos produtos de expressão plasmidial

Imunofluorescência Indireta

Inicialmente, a avaliação da expressão plasmidial nos parasitos transfectados foi realizada através de observação direta da fluorescência em microscópio, sob luz ultravioleta (figura 8A), assim como em ensaios de imunofluorescência indireta (conforme descrito no item 3.4). Nestes últimos, tanto a expressão da gp82 (figura 8B), utilizando o anticorpo primário 3F6, como a expressão da GFP utilizando o anticorpo anti-GFP, foram confirmadas na cepa *T.rangeli*-gp82. Inicialmente, utilizou-se o anticorpo secundário marcado com Alexa-fluor 488, no entanto, para evitar que houvesse sobreposição desta fluorescência com a naturalmente emitida pelo parasito devido a expressão da GFP, o anticorpo secundário marcado com Alexa-fluor 594 também foi utilizado, apresentando resultados semelhantes.

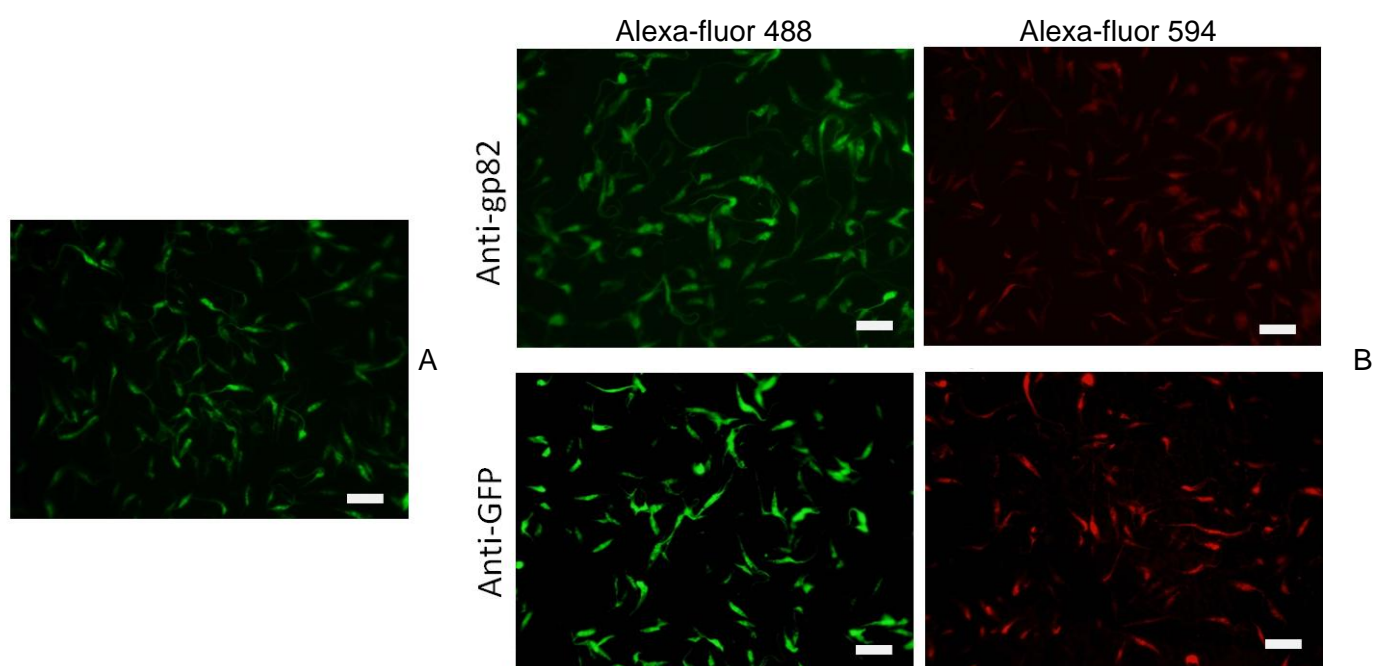


Figura 8: Expressão heteróloga das proteínas gp82 e GFP na cepa *T. rangeli*-gp82. (A), resultado da observação da fluorescência direta da GFP na cepa *T. rangeli*-gp82; (B) resultados de ensaios de imunofluorescência indireta utilizado os anticorpos primários 3F6 (anti-gp82) e anti-GFP, e os anticorpos secundários Alexa-fluor 488 e Alexa-fluor 594. As barras em branco representam 10 μ m.

Western blot

A expressão das proteínas heterólogas nos parasitos transfectados também foi confirmada pela realização de um ensaio de *western blot* (figura 9) com extratos protéicos de formas epimastigotas e tripomastigotas das cepas *T. rangeli*-gp82, *T. rangeli*-GFP, e *T. rangeli* (Choachí) e *T. cruzi* (Y).

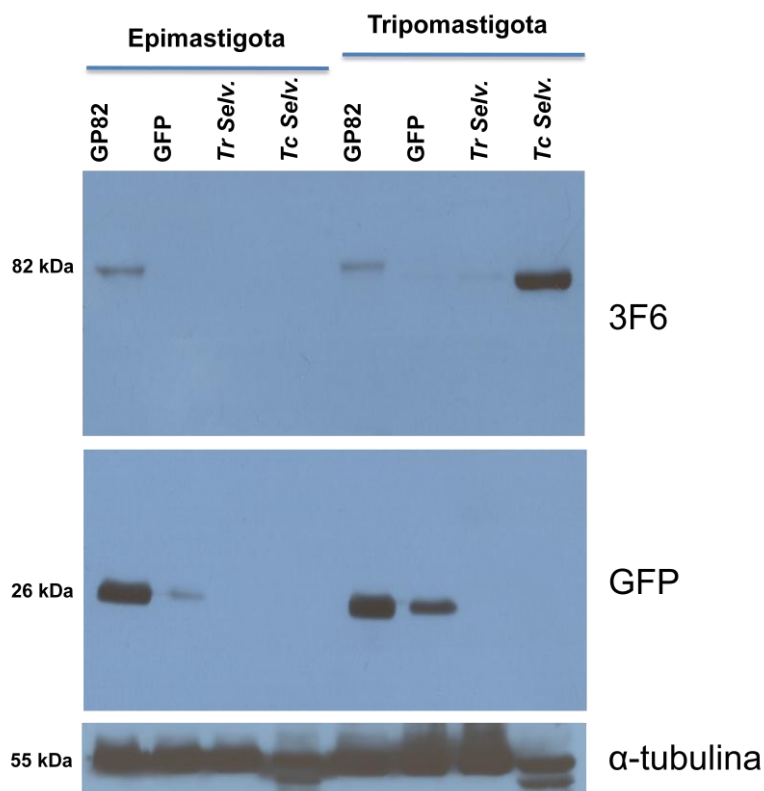


Figura 9: Avaliação da expressão heteróloga das proteínas gp82 e GFP por *western blot* em extratos protéicos totais de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*-gp82, *T. rangeli*-GFP, *T. rangeli* Choachí e *T. cruzi* Y, utilizando os anticorpos 3F6, anti-GFP e anti- α -tubulina.

O anticorpo 3F6 foi capaz de reconhecer um polipeptídio de 82 KDa nos extratos protéicos totais de formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa *T. rangeli*-gp82 (figura 9), bem como em tripomastigotas de *T. cruzi*. Conforme o esperado, o anticorpo anti-GFP reconheceu uma proteína de aproximadamente 26 KDa apenas nos extratos protéicos provenientes de parasitos transfectados com o plasmídeo pTEX-8523eGFP (*T. rangeli*-gp82) e com o plasmídeo pTEXeGFP (*T. rangeli*-GFP).

Análises de densitometria realizadas através do programa Labworks® (UVP) permitiram a quantificação das proteínas identificadas no *western blot*. Desta forma, foi possível confirmar uma

expressão reduzida da proteína gp82 nas formas epimastigotas (3,5 vezes) e tripomastigotas (6 vezes) de *T. rangeli*-gp82 em relação a expressão em formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Com relação a GFP, a expressão desta proteína foi considerada equivalente entre as duas formas nos extratos protéicos de *T. rangeli*-gp82, entretanto, foi diferencial entre *T. rangeli*-gp82 e *T. rangeli*-GFP, chegando a ser 9 vezes maior em epimastigotas *T. rangeli*-gp82 quando comparada a forma epimastigota de *T. rangeli*-GFP, o que pode ser explicado pelo menor tempo de seleção desta cultura em relação à primeira.

4.3 Localização celular da gp82 e da GFP nas cepas transfectadas de *T. rangeli*

Com o objetivo de avaliar a localização celular da gp82 e da GFP nas formas epimastigotas de *T. rangeli*-gp82 e *T. rangeli*-GFP os mesmos anticorpos anteriores foram utilizados em ensaios de imunofluorescência indireta, utilizando parasitos permeabilizados e não-permeabilizados.

Comparativamente, a localização celular da gp82 em *T. rangeli*-gp82 e em *T. cruzi* (figura 10) utilizando parasitos não-permeabilizados foi bastante similar, evidenciando-se uma fluorescência uniforme associada a superfície com destaque no flagelo das formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Já nos parasitos *T. rangeli*-gp82 permeabilizados, o anticorpo 3F6 revelou uma fluorescência mais concentrada na região central do parasito, o que pode ser resultante do processo de tradução protéica, ainda no citosol.

Ao se comparar a localização celular da GFP em parasitos *T. rangeli*-gp82 e *T. rangeli*-GFP (figura 11), observa-se um padrão de fluorescência distribuída pelo corpo celular de ambos os parasitos, havendo uma sutil concentração nos parasitos *T. rangeli*-GFP.

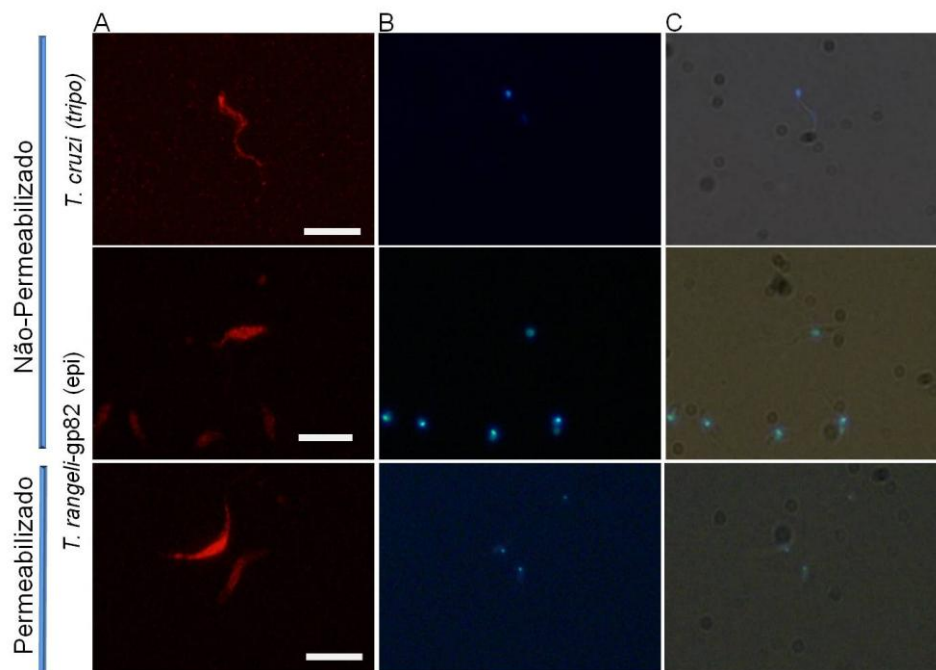


Figura 10: Localização celular da glicoproteína de superfície de 82 KDa em formas tripomastigotas de *T. cruzi* e formas epimastigotas de *T. rangeli-gp82*. (A) Imunofluorescência indireta utilizando o anticorpo primário 3F6, (B) coloração por DAPI e (C) sobreposição da imagem do parasito em campo claro e DAPI. As barras em branco representam 10 μ m.

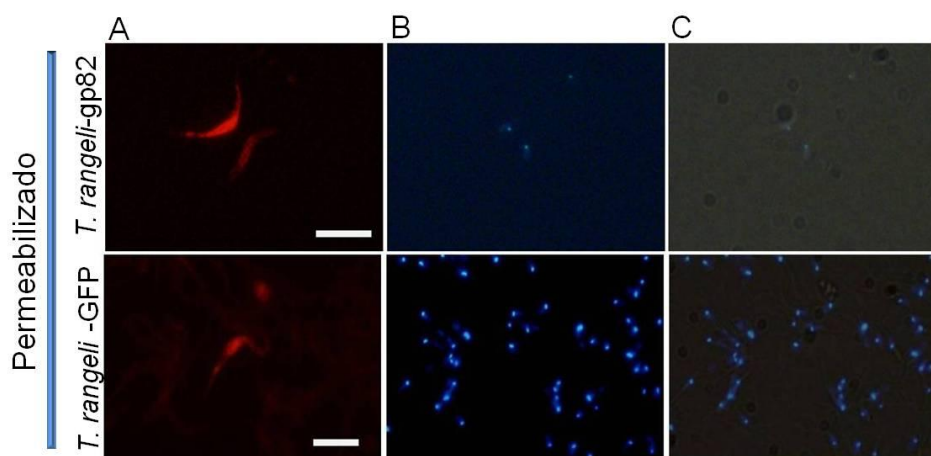


Figura 11: Localização celular da GFP em formas epimastigotas permeabilizadas de *T. rangeli-gp82* e *T. rangeli-GFP*. (A) Fluorescência revelada ao utilizar o anticorpo anti-GFP, (B) cloração por DAPI e (C) sobreposição da imagem do parasito em campo claro e DAPI. As barras em branco representam 10 μ m.

4.4 Análise comparativa da interação do *T. rangeli* transfectado com a gp82 de *T. cruzi* com a linhagem celular Vero

Decorridos 45 minutos do período de interação dos parasitos com as células Vero (figura 12) foi possível observar parasitos aderidos às células e também parasitos internalizados, caracterizados por uma estrutura arredondada nas três cepas de parasitos avaliados. No entanto, um maior número de parasitos internalizados pode ser observado na interação celular com *T. cruzi*. Resultados semelhantes foram encontrados 180 minutos após o tempo de interação.

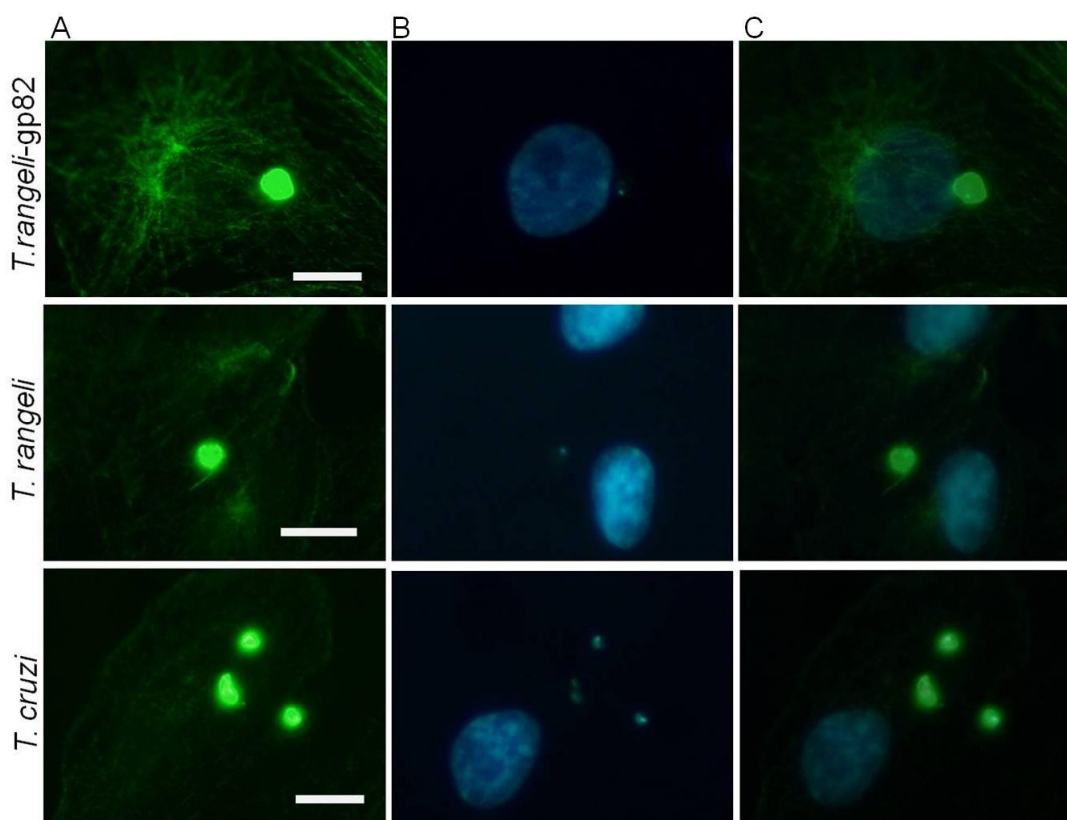


Figura 12: Imunofluorescência indireta do ensaio de interação parasito-célula hospedeira, após 45 minutos de interação. (A) Fluorescência relacionada ao anticorpo anti- α -tubulina; (B) coloração por DAPI; (C) sobreposição de A e B. As barras em branco representam 10 μ m.

O número de parasitos internalizados por célula pode ser melhor mensurado 16 horas após a interação dos parasitos com as células, nas lâminas coradas com Giemsa (figura 13). A contagem foi realizada de forma aleatória utilizando microscópio óptico, e em óleo de imersão. Duzentas (200) células de cada lâmina foram avaliadas, sendo que foram utilizados duas (2) lâminas de cada cepa para a contagem dos parasitos.

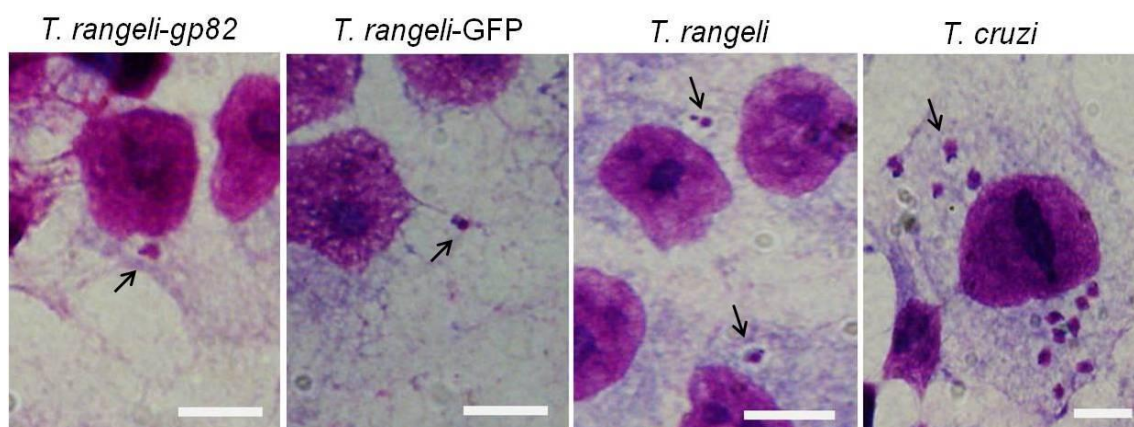


Figura 13: Ilustração da interação celular de *T. rangeli-gp82* comparada com os controles: *T. rangeli-GFP*, e cepas selvagens de *T. rangeli* e *T. cruzi*, depois de aproximadamente 16 horas do período de interação em lâminas preparadas com coloração de Giemsa. As setas apontam para os parasitos internalizados e as barras em branco representam 10 μm.

O teste de Tukey (GraphPad Instat) não revelou diferenças significativas no número de parasitos *T. rangeli-gp82*, *T. rangeli-GFP* e *T. rangeli* selvagem internalizados ($p>0,05$). Entretanto, quando comparadas as diferentes cepas de *T. rangeli* com *T. cruzi*, o resultado foi estatisticamente significativo (figura 14), apresentando um número de parasitos internalizados aproximadamente 3,5 vezes maior em relação ao *T. rangeli-gp82*. No entanto, o número amostral utilizado foi ainda reduzido e o desvio entre as amostras elevado, sendo necessária a realização de outros experimentos para uma inferência mais concreta a respeito da capacidade da proteína gp82 em facilitar a adesão e penetração de parasitos transfectados nas células hospedeiras.

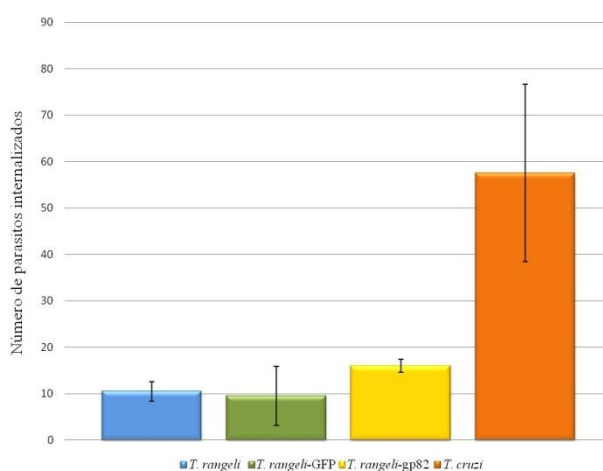


Figura 14: Representação gráfica do número de parasitos internalizados resultantes da interação do *T. rangeli* Choachí, *T. rangeli-gp82*, *T. rangeli-GFP* e *T. cruzi* com as células Vero, decorridos 16 horas da interação parasito-célula hospedeira.

Após 72 horas da interação (figura 15), ainda pode-se observar parasitos aderidos e internalizados correspondentes a todas as cepas de *T. rangeli* utilizadas, bem como para o *T. cruzi*. Nas células infectadas com *T. cruzi* observa-se um número elevado de formas amastigotas deste parasito, resultante da multiplicação das mesmas no interior das células. No entanto, nas cepas de *T. rangeli* poucos parasitos são observados, não havendo indicativo de que estes parasitos possuam capacidade de multiplicação intracelular.

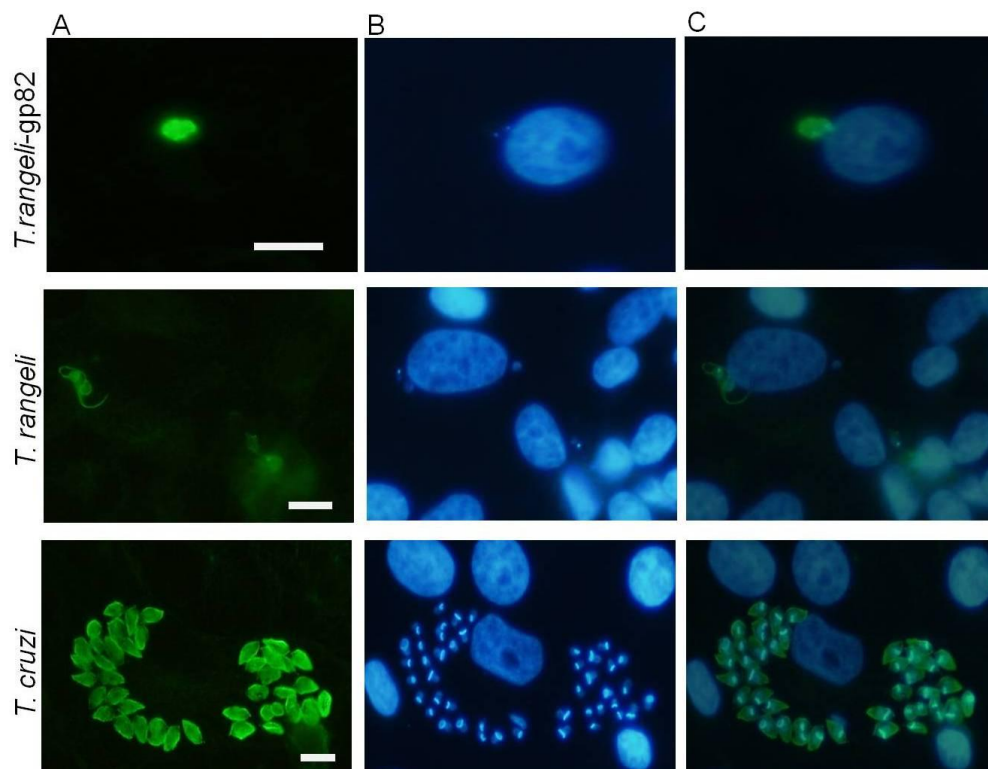


Figura 15: Imunofluorescência indireta do ensaio de interação parasito-célula hospedeira após 72 horas da interação. (A) Fluorescência relacionada ao anticorpo anti- α -tubulina; (B) coloração por DAPI; (C) sobreposição de A e B. As barras em branco representam 10 μ m.

Para este mesmo ensaio de interação, foi também avaliada a fluorescência resultante do anticorpo 3F6. No entanto, apesar de um reconhecimento eficiente no ensaio de *western blot*, o monoclonal 3F6 não se mostrou apropriado para a detecção dos parasitos nos ensaios celulares (figura 16), sendo que estes puderam ser detectados apenas pela visualização do núcleo e cinetoplasto na coloração por DAPI.

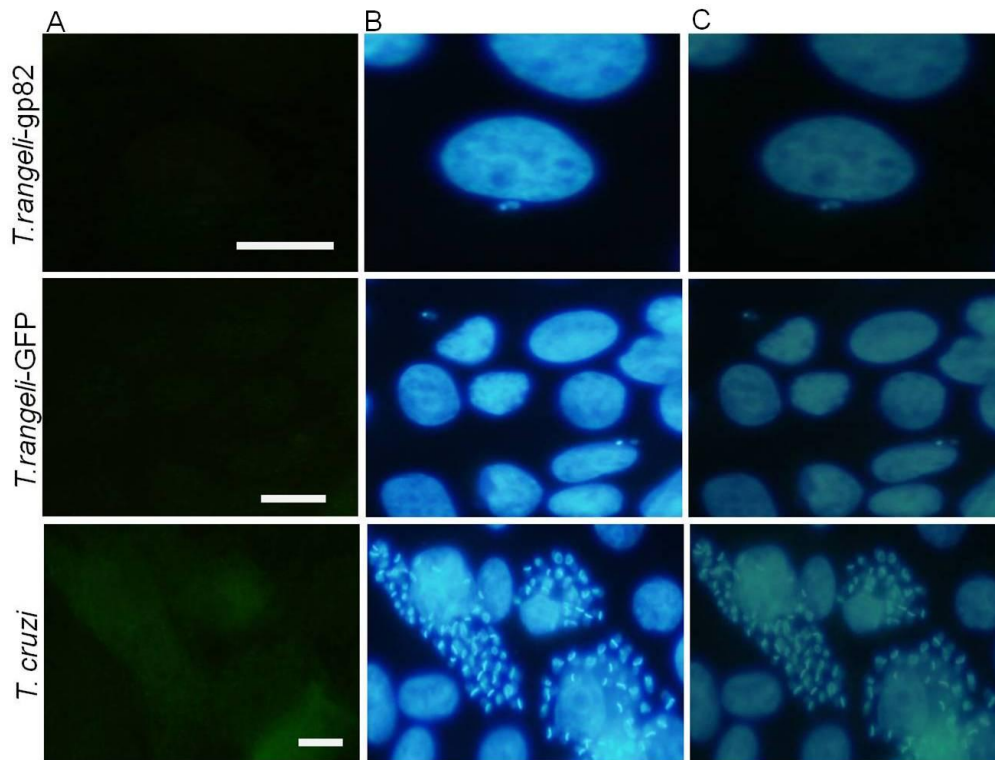


Figura 16: Imunofluorescência indireta do ensaio de interação parasito-célula hospedeira. Decorridas 72h da interação. (A) Fluorescência relacionada ao anticorpo anti-gp82 (3F6); (B) coloração por DAPI; (C) sobreposição de A e B. As barras em branco representam 10 μ m.

5. Discussão

Uma vez no hospedeiro mamífero, certos parasitos, como o *T. cruzi*, precisam penetrar na célula hospedeira para sobreviverem e multiplicarem-se. Os primeiros passos para que isso ocorra envolvem o reconhecimento superficial entre o parasito e a célula hospedeira, a adesão do parasito à membrana celular e, em seguida, a penetração. Uma grande variedade de receptores e proteínas de membrana estão envolvidos neste processo. No *T. cruzi*, aproximadamente 50% do genoma é dedicado a síntese destas proteínas de superfície, incluindo os membros da superfamília das Transsialidases (EL SAYED et al., 2005).

A glicoproteína de superfície de 82 KDa tem um papel essencial na adesão e penetração do *T. cruzi* às células (YOSHIDA, 2008), promovendo a entrada de formas infectivas do parasito através de uma cascata de sinalização e mobilização de Ca^{2+} em ambas as células (RUIZ et al., 1998; YOSHIDA et al., 2000). A gp82 de *T. cruzi* é reconhecida pelo anticorpo monoclonal 3F6 (anti-gp82 de *T. cruzi*); no entanto, este anticorpo não é capaz de detectar a expressão desta proteína em formas selvagens do *T. rangeli* (figura 8), podendo indicar a não expressão da mesma ou a inexistência de epítipo específico ao anticorpo testado.

Com o intuito de aprofundar o estudo do papel da gp82 na infecção celular, bem como apontar indícios da presença ou ausência de um ciclo intracelular do *T. rangeli* no hospedeiro mamífero, formas epimastigotas de *T. rangeli* transfectadas com o gene que codifica para a glicoproteína gp82 de *T. cruzi* foram utilizadas em ensaios de infecção com a linhagem celular Vero .

Uma das maneiras de avaliar a expressão da proteína heteróloga foi a utilização de um marcador fluorescente (GFP) transfectado juntamente com o gene da proteína de interesse (pTEX-8523eGFP), que permite a observação em microscópio da fluorescência naturalmente emitida pelo parasito devido a expressão da GFP. Segundo estudos anteriormente realizados com o marcador fluorescente, este não causa alterações no crescimento e infectividade dos parasitos transfectados com a GFP (ALMEIDA, 2005; PIRES et al, 2007; FLORENCIO-MARTÍNEZ et al., 2010).

Na avaliação do crescimento dos parasitos realizada neste trabalho, constatamos que os parasitos transfectados com o plasmídeo pTEX-8523eGFP tiveram um crescimento similar ao dos parasitos controles (figura 7). No entanto, os parasitos transfectados apenas com o pTEXeGFP apresentaram um crescimento reduzido. Uma possível razão para esta diferença pode estar relacionada ao recente processo de transfecção e a condição de manutenção destes parasitos com cinco vezes mais G-418 que a outra cepa transfectada. Apesar desta diferença, ambos os parasitos, *T. rangeli*-gp82 e *T. rangeli*-GFP, foram capazes de se diferenciar em formas tripomastigotas, sendo a expressão das proteínas heterólogas após a diferenciação confirmada através de ensaios de *western blot* (figura 9).

Através da análise do *western blot* (figura 9) por densitometria, confirmou-se a expressão reduzida da gp82 nos parasitos de *T. rangeli*-gp82 em relação ao *T. cruzi*. Além da expressão da gp82 em *T. rangeli* ser induzida, esta diferença pode ser decorrente do número de cópias do gene que codifica para a gp82 presente no *T. cruzi*, uma vez que este gene é encontrado em vários cromossomos deste parasito (CORDERO, 2007).

A localização celular da gp82 em formas tripomastigotas de *T. cruzi* foi analisada por Atayde e colaboradores (2007) estando distribuída por todo o corpo celular, tanto em parasitos permeabilizados como não-permeabilizados, evidenciando o destino membranar da proteína. Nos parasitos *T. rangeli*-gp82, a proteína gp82 apresentou uma localização celular semelhante, sendo possível visualizar a fluorescência distribuída uniformemente na região central dos parasitos permeabilizados e superficialmente nos parasitos não-permeabilizados. Quanto à citolocalização da GFP, o resultado foi semelhante entre o parasito *T. rangeli*-gp82 e *T. rangeli*-GFP, apresentando uma fluorescência igualmente distribuída pelo corpo celular dos parasitos não-permeabilizados, estando de acordo com o descrito por Guevara e colaboradores (2005).

Diversos estudos de interação parasito-hospedeiro já foram realizados com cepas de *T. rangeli* isoladas de diferentes regiões geográficas e distintas linhagens celulares, buscando elucidar o ciclo de vida deste parasito. Em 1995, Osorio e colaboradores revelaram que o clone Ub66-5b da cepa San

Agustin de *T. rangeli*, proveniente de cultura e de glândula salivar de *Rhodnius prolixus*, foi capaz de infectar a linhagem celular U937 (promonócito) em baixas proporções. O mesmo acontece com as cepas SC-58, Macias e Choachí ao interagirem com células Vero e promonócitos J774G.8, em que apenas uma ou duas formas intracelulares foram observadas por célula infectada 72 horas após a interação (EGER-MAGRICH et al., 2001). Entretanto, ambos os autores constatarem que, apesar de os parasitos se manterem viáveis no interior das células por um tempo prolongado, superior a 144 horas (EGER-MAGRICH et al., 2001) e mais de 25 dias (OSORIO et al., 1995), não há evidência de multiplicação intracelular destes parasitos.

Em contrapartida, Zuñiga e colaboradores (1997), utilizando a cepa C23 de *T. rangeli* com as linhagens celulares Vero e J774, mostrou um grande número de parasitos aderidos e alguns internalizados após quatro horas de interação parasito-célula. Transcorridos seis dias, 50% das células Vero e 47% das J774 estavam infectadas com um número maior de parasitos internalizados. Apresentando ainda, no oitavo dia, o começo de um segundo ciclo de infecção. No entanto, estes resultados precisam ser melhor investigados, uma vez que os parasitos encontrados no interior das células e, também, o aumento no número de parasitos internalizados, podem ser decorrentes de uma possível contaminação da cultura da cepa C23 com *T. cruzi*. Estes resultados podem ser um indicativo de que a capacidade de o *T. rangeli* se reproduzir no hospedeiro mamífero esteja relacionada ou dependa das características da cepa utilizada, ou mesmo que não sejam tipos celulares compatíveis com a divisão parasitária.

Nos ensaios de interação realizados neste trabalho, foi possível observar parasitos aderidos e internalizados após 45 minutos da interação parasito-célula (figura 12) para todas as cepas de *T. rangeli* utilizadas (*T. rangeli*-gp82, *T. rangeli*-GFP e *T. rangeli* selvagem). O mesmo foi observado 180 minutos e 72 horas depois, não havendo diferenças significativas no número de parasitos internalizados entre os parasitos transfectados com o gene que codifica para a gp82 e os demais parasitos da mesma espécie (figura 14). A infecção se caracterizou por um número de parasitos bastante baixo e sem aparente prejuízo para as células infectadas. Apesar disso, a gp82 expressa de

forma heteróloga pode estar sim envolvida no processo de adesão e interiorização, mas não afetar o número de parasitos internalizados e nem o desenvolvimento destes no interior da célula hospedeira.

Em comparação com o *T. cruzi*, utilizado como controle, decorrido o mesmo período de 72 horas, observou-se a capacidade deste parasito de infectar as células, manter a infecção e de se multiplicar no interior das células Vero (figura 15), mostrando um número de amastigotas aproximadamente 3,5 vezes maior em relação ao *T. rangeli*-gp82 (figura 14). Evidencia-se assim, a efetividade do controle positivo utilizado nos ensaios de interação, as características naturais do parasito *T. cruzi* mostram-se essenciais e tem um impacto direto na multiplicação celular deste parasito.

Nos ensaios de interação em que foi utilizado o anticorpo monoclonal 3F6 (figura 16), não foi possível visualizar os parasitos através da marcação do anticorpo, mas somente pela coloração por DAPI, mesmo para o *T. cruzi*. Este resultado pode ser decorrente da expressão estágio específica da gp82, estando presente na superfície apenas de formas tripomastigotas e ausente nas formas epimastigotas e, também, amastigotas do *T. cruzi* (ARAYA, 1994).

Apesar dos resultados encontrados, temos clareza de que o número de experimentos ainda é insuficiente e o desvio entre as amostras elevado, fazendo-se necessária a realização de outros ensaios para uma inferência mais concreta a respeito da capacidade da proteína gp82 em facilitar a adesão e penetração de parasitos transfectados nas células hospedeiras. De forma análoga aos estudos realizados em *T. cruzi*, visamos realizar estudos de inibição da interação com a incubação prévia dos parasitos transfectados e controle com o anticorpo 3F6 a fim de possuir um controle negativo da interação.

6. Conclusões

Os nossos resultados, ainda que preliminares, permitem alcançar as seguintes conclusões:

- A transfecção dos parasitos com o plasmídeo pTEX-8523eGFP não alterou o crescimento das culturas e a proteína continua sendo expressa mesmo após a diferenciação em formas tripomastigotas;
- A localização celular da gp82 nos parasitos *T. rangeli*-gp82 está distribuída de maneira uniforme na superfície do parasito;
- Os parasitos transfectados foram capazes de infectar as células da linhagem Vero, no entanto o número de parasitos *T. rangeli*-gp82 internalizados foi significativamente inferior ao observado para o *T. cruzi*;
- Nenhuma das cepas de *T. rangeli* avaliadas apresentou capacidade de multiplicação intracelular até 72 horas pós interação.

7. Perspectivas

A realização de outros ensaios de interação parasito-célula hospedeira vem a ser a perspectiva mais imediata deste trabalho. Uma vez que o processo já está bem padronizado, será necessário aumentar o número amostral para que a avaliação da capacidade de invasão celular dos parasitos *T. rangeli*-gp82 em células Vero seja suficiente para se obter um resultado concreto. Outras linhagens celulares também poderão ser utilizadas para estes ensaios.

Em seguida, a capacidade dos parasitos *T. rangeli*-gp82 completarem o ciclo de vida poderá ser avaliada. A presença do marcador fluorescente (GFP) permitirá acompanhar o curso da infecção no hospedeiro invertebrado e mamífero e analisar a possível presença dos parasitos em diferentes tecidos nos hospedeiros. Além disso, a avaliação dos níveis de parasitemia *in vivo* do *T. rangeli*-gp82 em relação a cepa homóloga e ao *T. cruzi* também é uma das perspectivas.

Apesar da gp82 ser fundamental na adesão e infecção celular, outras moléculas, principalmente antígenos de superfície, estão envolvidas neste processo. Assim, uma das perspectivas deste estudo é o desenvolvimento e construção de um novo vetor a fim de se realizar uma transfecção integrativa, em *T. rangeli*, da gp82 e outra molécula também relevante na interação celular.

8. Referências

- AFCHAIN, D. et al. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: Identification of a specific component. **J. Parasitol.**, 65: 507-514, 1979.
- ALMEIDA, J.H. **Avaliação da expressão da proteína verde fluorescente pelo *Trypanosoma rangeli* e desenvolvimento de vetor para a transfecção integrativa no parasito.** Santa Catarina: UFSC, 53f, 2005.
- ATAYDE, V. et al. Expression and cellular localization of molecules of the gp82 family in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. **Infection and Immunity**, 7: 3264–3270, 2007.
- ANDREWS, N. W. et al. Stage-specific surface antigens during the morphogenesis of *Trypanosoma cruzi*: developmentally regulated expression of a glycosyl-phosphatidylinositol anchored glycoprotein of amastigotes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 1: 561-562, 1988.
- ARAYA, J.E. Cloning and characterization of a gene for the stage-specific 82-kDa surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 65(1):161-169, 1994.
- BARRY, J. D. et al. Specific mechanisms for activation and expression of variant surface glycoprotein genes in *Trypanosoma brucei*. **Biochem. Soc. Trans.**, 18: 708-710, 1990.
- BUSCAGLIA, C. A., et al. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature Ver. Microb.**, 4: 229-236, 2006.
- BUSCHIAZZO, A. et al. *Trypanosoma rangeli* sialidase: cloning, expression and similarity to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Glycobiology**, 8:1167-1173, 1997.
- CHIURILLO, M. A. et al. Comparative study of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* telomeres. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 120: 305-308, 2002.
- CHIURILLO, M. A. et al. *Trypanosoma rangeli* express a gene of the group II trans-sialidase superfamily. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 142: 133-136, 2005.
- COLLI, W. Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoon *Trypanosoma cruzi*. **FASEB J.**, 7: 1257-1264, 1993.
- CORDERO E. M. V. **Expressão *in vitro* e *in vivo* dos genes que codificam antígenos de superfície gp82 e gp90 de tripomastigotas metacíclicos de *Trypanosoma cruzi*.** São Paulo: UFSP, 119f, 2007 (Tese de doutorado).
- CRENNEL, S. J. et al. First crystal structure of a bacterial sialidase (*Salmonella thyphimurium* LT2) shows same fold as influenza virus neuraminidase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 90: 9842-9856, 1993.
- CROSS, G. A. M. et al. The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. **Annu. Rev. Microbiol.**, 46: 385-411, 1993.
- CROXFORD, J. K. et al. Effects of cannabinoid treatment on Chagas disease pathogenesis: balancing inhibition of parasite invasion and immunosuppression. **Cell. Microbiol.**, 71: 1592-1602, 2005.
- CUBA CUBA, A. Review of the biological and diagnostic aspects of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.**, 31: 207-220, 1998.

- D'ALESSANDRO, A. Biology of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Ed.). **Biology of Kinetoplastida**, 1976.
- DE LEON, J. R. Nota preliminar acerca de la enfermedad de Chagas em Guatemala. Casos encontrados em el oriente de la Republica y probable existencia de un nuevo tripanosoma humano. **Rev. Cruz Roja Guatemalteca**, 9: 131-132. 1942.
- EGER-MANGRICH, I. et al. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines *in vitro*. **Parasitol. Res.**, 87: 505-9, 2001.
- EL SAYED, N. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, 309: 409-415, 2005.
- FRASCH, A. C. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today**, 16: 282-286, 2000.
- FLORENCIO-MARTÍNEZ L., et al. Cellular analysis of host cell infection by different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, 126: 332-336, 2010.
- GRISARD, E. C. et al. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: overview. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94: 203-209, 1999.
- GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. In: **Parasitologia Humana**, Davis P. Neves (editor). Editora Atheneu, 11^a edição. 2005.
- GRISARD, E.C. et al. Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite *Trypanosoma rangeli*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 174:18-25, 2010.
- GUEVARA, P. et al. Expression of fluorescent genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (kinetoplastida: trypanosomatidae): Its application to parasite-vector biology. **J. Med. Entomol.**, 42: 48-56, 2005.
- HALL, B.F. et al. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for surface neuraminidase facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. **J. Exp. Med.**, 176: 313-325, 1992.
- HARRISON, J. A. et al. Hydrolase and sialyltransferase activities of *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase towards NeuAc- α -2,3-Gal- β -O-PNP. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 11: 141-144, 2001.
- HAYNES, P.A. et al. Subcellular localization of *Trypanosoma cruzi* Gp82. **J. Cell. Sci.**, 109: 2979-2988, 1996.
- HOARE, C.A.; WALLACE, F.G.; Developmental stages of trypanosomatid flagellate: a new terminology. **Nature**, 244: 69-70, 1966.
- JAZIN, E. et al. *Trypanosoma cruzi* exoantigens is a member of 160-kDa gene family. **Parasitol.**, 110: 61-69, 1994.
- JÄGER, A. V. et al. Stage-specific expression of *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase involves highly conserved 3' untranslated regions. **FEMS Microbiol. Lett.**, 283: 182-188, 2008.
- KATZIN, A. M.; COLLI, Walter. Lectin receptors in *Trypanosoma cruzi*: an N-acetyl-glucosamine containing surface glycoprotein specific for the trypomastigote stage. **Biochimica and Biophysica Acta**, 727: 403-411, 1993.

- KOERICH, L. B. et al. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: High production of infective trypomastigote forms *in vitro*. **Parasitol. Res.**, 88: 21-25, 2002.
- KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J. Immunol.* 128(5): 2009-2012, 1982.
- MANQUE, P. M. et al. Characterization of the cell adhesion site of *Trypanosoma cruzi* metacyclic stage surface glycoprotein gp82. **Infect. Immun.**, 68: 478-484, 2000.
- MASLOW, D.A.; SIMPSOM, L. Evolution of parasitism in Kinetoplastid protozoa. **Parasitol. Today**, 11: 30-32, 1995.
- MING, M. et al. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosomes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 59: 243-252, 1993.
- NEIRA, I. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. **Infect. Immune**, 71: 557-561, 2003.
- OLIVEIRA, M. F. et al. Tratamento etiológico da Doença de Chagas. **Rev. de Patolog. Tropical**, 37: 209-228, 2008.
- OSORIO, Y. et al. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. **J. Parasitol.**, 81: 687-693, 1995.
- PIRES, S. F. et al. Cell culture and animal infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains expressing red and green fluorescent proteins. **Int. J. Parasitol.**, 38: 289-297, 2008.
- PONTES DE CARVALHO, L. C. et al. *Trypanosoma rangeli* sialidase lacks *trans*-sialidase activity. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 62: 19-26, 1993.
- RAMIREZ, M. I. et al. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. **Infect. Immun.**, 61: 3636-3641, 1993.
- ROGGENTIN, P. et al. The sialidase superfamily and its spread by horizontal gene transfer. **Mol. Microbiol.**, 9: 915-921, 1993.
- RUIZ, R. C. et al. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. **Biochem. J.**, 330: 505-511, 1998.
- SANTORI, F. R. et al. A recombinant protein based on the *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote 82-kilodalton antigen that induces an effective immune response to acute infection. **Infect. Immun.**, 64: 1093-1099, 1996.
- SANTORI, F. R. et al. Identification of a domain of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 required for attachment and invasion of mammalian cells. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 78: 209-216, 1996a.
- SCHENKMAN, S. et al. *Trypanosoma cruzi* transsialidase and cell invasion. **Parasitol. Today**, 9: 218-221, 1994.
- SCHOFIELD, C.J. et al. The future of the Chagas disease control. **Trends in Parasitol.**, 22: 583-587, 2006.

- SIQUEIRA, A. M. Subfilo Mastigophora. In: **Parasitologia Humana**, Davis P. Neves (editor). Editora Atheneu, 11^a edição. 2005.
- SNOEIJER, C. Q. et al. *Trypanosoma rangeli* transcriptome project: Generation and analysis of expressed sequence tags (ESTs). **Kinet. Biol. Dis.**, 3: 1-4, 2004.
- TEIXEIRA, M. M. G. et al. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibody. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 18: 271-282, 1986.
- TOMLINSON, S. et al. Role of sialic acid in resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. **J. Immunol.**, 153: 3141-3148, 1994.
- VALLEJO, G. A. et al. Behavior of the infection and morphologic differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the intestine of the vector *Rhodnius prolixus*. **Rev. Bras. Biol.**, 48: 577-587, 1988.
- VAN VOORHIS, W. et al. Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the FL-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 88: 5993-5997, 1991.
- VAN VOORHIS, W. et al. FL-160 proteins of *Trypanosoma cruzi* are expressed from a multigene family and contains two distinct epitopes that mimic nervous tissues. **J. Exp. Med.**, 178: 681-694, 1993.
- YOSHIDA, N. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *T. cruzi*. **Infect. Immun.**, 40: 836-839, 1983.
- YOSHIDA, N. et al. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 33: 269-278, 2000.
- YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **An. Acad. Bras. Cienc.** 78 (1): 87-111, 2006.
- YOSHIDA, N; CORTEZ, M. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. **Subcell. Biochem.**, 47: 82-91, 2008.
- ZUÑIGA, T. Characterization of a *Trypanosoma rangeli* Strain of Colombian Origin. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 92: 523-530, 1997.